红树木榄生境中可培养细菌物种多样性及其体外抗乙肝病毒活性研究

候师师，梁考云，高程海，蒋翠萍，唐倩倩，刘永宏，易湘茜*

（广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院，南宁 530200）

摘要：红树生境微生物菌群丰富，其次生代谢产物结构新颖，是挖掘新型药物的重要来源。该研究初步评价木榄沉积物、根、叶以及胚轴的可培养细菌多样性以及细菌生物活性，寻找抗乙肝病毒的药源菌株。利用纯培养技术和 16S rRNA 分子生物学技术确定细菌种属并进行物种多样性分析。以 HepG2.2.15 细胞株为模型，通过 MTT 和 PCR 技术测试细菌代谢产物的抗乙肝病毒活性。使用 LC-HRMS 技术对活性菌株代谢产物进行初步分析。结果表明：（1）本次研究共获得细菌 59 种，分属 4 门 5 纲 14 目 23 科 36 属，其中芽孢杆菌为优势菌属。菌株 GXIMD07402、GXIMD07665、GXIMD07384 分别为 *Pseudooceanicola* 属、*Thioclava* 属和 *Aestuariibaculum* 属潜在新种。（2）抗乙肝病毒活性结果显示 GXIMD07366、GXIMD07616、GXIMD07384 、GXIMD07550、GXIMD07445X 提取物能显著降低 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 水平（$P<0.05$），抑制率分别为 51%、47%、63%、52%、47%。（3）初步鉴定强活性菌株 GXIMD07384 的 4 个主要代谢产物有 Adenosine 、 Cyclo(L-Pro-L-OMet) 、 Acremine G 和 7,8-dimethylbenzo[g] pteridine-2,4(1H,3H)-dione。研究结果表明木榄生境中可培养细菌物种多样性丰富，且含有能产生抗乙肝病毒活性化合物的菌株，为后续海洋微生物资源的应用提供了基础。

关键词：木榄，可培养细菌，物种多样性，代谢产物，抗乙肝病毒活性

中图分类号：Q939.1；R946　　　　　**文献标识码：**A

Species diversity and anti-hepatitis B virus activity of culturable bacteria isolated from the habitat of *Bruguiera gymnorrhiza*

HOU Shishi, LIANG Kaoyun, GAO Chenghai, JIANG Cuiping, TANG Qianqian, LIU Yonghong, YI Xiangxi*

(*Institute of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy*, Guangxi *University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China)

Abstract: Mangrove habitat is rich in microfloras and its secondary metabolites have novel structure, which is an important source for mining new drugs. This study preliminarily evaluated the culturable bacterial diversity of sediments, roots, leaves and hypocotyl of *Bruguiera gymnorrhiza* and the biological activity of bacterial metabolites, and looked for anti-HBV drug

---

基金项目：国家自然科学基金(81903533，U20A20101)；广西自然科学基金(2018GXNSFAA281268, 20GXNSFGA297002)；校级项目(YCXJ2021133)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (81903533, U20A20101); Guangxi Natural Science Foundation (2018GXNSFAA281268, 20GXNSFGA297002); University-Level Project (YCXJ2021133)]。

作者简介：候师师（1996-），硕士研究生，主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究，（E-mail）18434376392@163.com。

***通信作者：**易湘茜，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事海洋生物资源应用研究，（E-mail）42672960@qq.com。

source strains. Pure culture technique and 16S rRNA molecular biology technique were employed to determine the species of bacteria and analyze the species diversity. Using HepG2.2.15 cell line as a model, the anti-HBV activity of bacterial metabolites was tested by MTT and PCR techniques. The secondary metabolites of active bacteria were preliminary analyzed by LC-HRMS. The results were as follows: (1) A total of 59 species of bacteria were obtained, which belonging to 4 phyla, 5 classes, 14 orders, 23 families, and 36 genera, among which *Bacillus* was the dominant genus. Strains GXIMD07402, GXIMD07665 and GXIMD07384 are potential new species of *Pseudooceanicola*, *Thioclava*, and *Aestuariibaculum*, respectively. (2) The results of anti-HBV activity showed that GXIMD07366, GXIMD07616, GXIMD07384, GXIMD07550 and GXIMD07445X could significantly reduce the level of HBV DNA in the supernatant of HepG2.2.15 cells, and the inhibition rates were 51%, 47%, 63%, 52%, and 47%. (3) Four main secondary metabolites of the highly active strain GXIMD07384 were identified as Adenosine, Cyclo(L-Pro-L-OMet), Acremine G, and 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine -2,4(1H,3H)-dione. The results of the study confirm that the species diversity of culturable bacteria in the habitat of *Bruguiera gymnorrhiza* is rich and contains anti-HBV active strains, which provide a basis for the subsequent application of marine microbial resources.

Key words: *Bruguiera gymnorrhiza*, culturable bacteria, species diversity, metabolites, anti-HBV activity

红树林是独特的沿海生态系统，物质流、能量流密集，表现出较高的生产力，孕育着庞大的微生物群落，是新物种和多种生物活性化合物的来源（Lin et al., 2020）。细菌作为微生物的最大类群，在工业、医药等方面有着重要价值。Jiang et al.（2018）从广西北仑口 5 种红树植物中分离得到 101 株内生放线菌，包括 7 株潜在新种，抑菌试验中 31 株菌显示阳性，其中 21 株菌对抗性病原体表现出抑制活性。李菲等（2021）从海芒果根际和组织中分离出可培养细菌 71 株，15 株菌株具有抗农用真菌活性，其基因组 DNA 均扩增出至少 1 种次级代谢产物合成基因。李蜜等（2018）从海南西海岸红树植物中分离得到 32 株细菌，1 株新物种，3 株延缓线虫衰老的活性菌株。众多研究表明红树生境细菌资源丰富，是发现活性天然产物的重要来源，值得我们进一步探索。

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）是一种嗜肝型 DNA 病毒，长期感染会引发肝硬化、肝癌，严重危害人类健康（Sarin, 2016）。全球 HBsAg（HBV surface antigen）阳性率高达 3.9%，约 2.92 亿患者，每年约有 100 多万人死于 HBV 感染所致的终末期疾病（Razavi-Shearer et al., 2018）。中国普通人群的 HBV 感染率为 6.89%，乙肝病毒患者有 8 300 万人，每年有 30 万人因慢性乙型肝炎致死（Wang et al., 2019）。目前公认有效的治疗乙型肝炎药物主要是干扰素和核苷类药物，但在临床应用中存在副作用大、价格昂贵、易耐药、以及治愈率低等诸多不足（Zhang et al., 2015；Shi et al., 2017），寻找新型高效的抗乙肝病毒药物仍为我国亟待解决的难题。木榄（*Bruguiera gymnorrhiza*）为红树科木榄属植物，具有清热解毒功效，京族医书有用其主治乙型肝炎的记录（张帅等, 2016）。本课题组前期从木榄胚轴中分离得到 7 个氰苷类化合物有抑制乙肝病毒复制活性，其 IC_{50} 值范围为 5.1 ± 0.2 μg·mL^{-1}～87.7 ± 5.8 μg·mL^{-1}（Yi et al., 2015）。然而由于红树资源的生态价值突出以及难再生性，使得大规模采集木榄胚轴用于抗乙肝病毒研究受到制约。微生物具有菌种易保存，生长周期短，代谢可调控等优点，可大规模发酵成为药物开发的战略资源。目前，有关木榄生境中可培养细菌报道较少，且多集中于抑菌活性。Ding et al. (2011) 从木榄茎部内生链霉菌 *Streptomyces* sp.中分离得到 4 个新的安莎霉素类大环内酯化合物 divergolides A~D，对 *Bacillus subtilis*、*Mycobacterium vaccae*、MRSA 和 VRE 多种细菌有较强的抑制活性。Yan et al. (2010) 从木榄叶中分离得到 1 株链霉菌 *Streptomyces albidoflavus*，从中分离得到第一个天然的 8-乙酰氧基的抗霉素 antimycin A18，对植物病原菌有良好的杀菌活性，抗乙肝病毒活性未见报道。

因此，本研究开展木榄生境中可培养细菌物种多样性及测试其代谢产物抗乙肝病毒

活性研究，为药用红树资源充分挖掘利用和抗乙肝药物开发提供药源菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用样品

2019 年 5 月在广西北仑河口红树林自然保护区(108º14′11″ E、19º36′55″ N)采集木榄生境沉积物、木榄根、叶、胚轴样品。木榄沉积物用灭菌铲挖取深度为 5 cm 土壤，木榄根、木榄叶和胚轴直接采取后用无菌水冲洗表面，各样品分别装在密封袋内，保存于采样冰盒中，带回实验室处理。

1.1.2 分离用培养基

分离培养基：燕麦培养基（P3）；酪氨酸-天冬酰胺培养基（P7）；海藻糖-脯氨酸培养基（M5）；改良 ISP5 培养基（M7）；精氨酸-天冬酰胺培养基（M9）；改良淀粉-水解酪素培养基（M10）；棉籽糖-组氨酸培养基（M11）；改良的高氏培养基、R2A、2216E（AGG）。一共 10 种培养基，培养基详细配方参考文献（李蜜等，2020）。

纯化培养基：改良 ISP2 固体培养基（酵母提取物 2.0 g，麦芽提取物 2.0 g，葡萄糖 2.0 g，琼脂 20.0 g 和海水 1 000 mL）。

发酵培养基：改良 ISP2 液体培养基、加 0.1%小球藻的改良 ISP2 液体培养基。

1.1.3 实验用细胞

HepG2.2.15 细胞株：广西艾滋病防治研究重点实验室叶力教授惠赠。

细胞完全培养基：90% DMEM 培养基，10%胎牛血清，100 U mL^{-1} 青链霉素。

1.1.4 实验试剂

Chelex-100 树脂，2×Easy Taq Supermix 购于美国 BioRad 公司；16S rRNA 基因扩增引物对 27F 和 1492R 购于全式金生物技术有限公司，其他分离培养基用试剂均为国产分析纯；DMEM 培养基，胎牛血清，青链霉素，生物级二甲基亚砜（DMSO）购于美国 Gibco 公司；噻唑蓝（MTT）购于美国 Sigma 公司，拉米夫定（3TC）购于上海麦克林生化科技有限公司；DNA 病毒基因组提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司（中国，北京）；HBV DNA 定量测定试剂盒购于湖南圣湘生物科技有限公司。

1.1.5 主要仪器

SW-CJ-2F 超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；TAdvanced 96PCR 扩增仪（Biometra，德国）；ZWYP-2102 恒温培养振荡器（上海智城分析仪器制造有限公司）；HR1500-ⅡB2 生物安全柜（青岛海尔生物医疗股份有限公司）；MCO-170AICDL-PC 全波长多功能酶标仪（Tecan，瑞士）；Light Cycler480Ⅱ高通量实时荧光定量 PCR 系统（Roche，瑞士）。

1.2 方法

1.2.1 样品的预处理

样品处理方法参考李菲等（2018）方法。木榄根、叶、胚轴先用无菌水清洗、再用 75%酒精浸泡 2 min，最后用无菌水冲洗除去酒精。取大约 2.0 g 沉积物样品和木榄各组织样品，分别置于无菌研钵中加 2 mL 海水充分研磨，作为样品原液。用无菌海水依次稀释成 10^{-3} g mL^{-1} 和 10^{-4} g mL^{-1} 样液。

1.2.2 木榄生境中可培养细菌的分离纯化

取 10^{-3} g mL^{-1} 和 10^{-4} g mL^{-1} 样液 100 μL 均匀涂布于 10 种分离培养基，28 ℃恒温培养箱中倒置培养 2～6 周，不同形态的单菌落被挑取后，再接种于 ISP 2 培养基，利用三区划线纯化菌株。将生长良好且无污染的菌体保藏于 20%（V/V）甘油管中，4 ℃冰箱短期存放，-80 ℃冰箱长期保存。

1.2.3 细菌的分子生物学鉴定

提取目标菌株的基因组 DNA 采用 Chelex-100 Resin 法（周双清等，2010）并参照 Walsh et al.（1991）的方法进行 PCR 梯度扩增。通用引物 27F 和 1492R 用于 16S rRNA

基因片段的扩增。扩增产物用 1%琼脂糖（W/V）凝胶电泳检测后，委托上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司完成 16S rRNA 基因测序。

测序结果经 SeqMan 软件整理，利用 EzBioCloud（https://www.ezbiocloud.net/）服务器进行在线分析（Kim et al., 2012）获取同源性最高的典型菌株序列。利用 Venny 在线分析网站，在属级水平上对木榄不同来源细菌类群分布进行韦恩图分析。

1.2.4 菌株代谢产物的制备及代谢产物多样性的筛选

将对数生长期菌株分别接种到两种液体发酵培养基后，于 28 ℃、180 r·min^{-1} 摇床发酵培养 7 d。发酵液用等体积乙酸乙酯萃取，萃取相经减压浓缩后置于干燥器中低温保存备用。利用 HPLC-DAD 分析菌株代谢产物，初步筛选出代谢产物较为丰富的菌。（ISP2 培养基发酵产物样品命名为"细菌编号"，含 0.1%小球藻的 ISP2 液体培养基发酵产物命名为"细菌编号 X"，两份空白培养基对照命名为"GXIMD00000"和"GXIMD00000X"）。

1.2.5 菌株代谢产物对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响

代谢产物较为丰富的菌株进行抗乙肝病毒实验，用生物级 DMSO 完全溶解后以完全培养基稀释至浓度为 500、250 和 125 μg·mL^{-1}。取对数生长期细胞，调整细胞浓度为 5×10^{4} 个·mL^{-1}，接种于 96 孔板，每孔 100 μL，贴壁培养 24 h 后，换入含药培养液，同时设空白组和阳性对照组（100 μg·mL^{-1} 3TC）。培养 72 h 后吸取上清，加入 5 mg·mL^{-1} MTT 溶液 50 μL，37 ℃孵育 4 h，弃去孔内 MTT 溶液，加入 DMSO 100 μL，震荡 10 min。在 490 nm 波长下测定各孔光吸收值，计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组 A_{490} 值/阴性对照孔 A_{490} 值)×100%。

1.2.6 检测菌株代谢产物对 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 的影响

选取对细胞增殖无抑制作用的菌株代谢产物进行后续抗乙肝病毒活性实验。取对数生长期 HepG2.2.15 细胞制成 5×10^{5} 个·mL^{-1} 细胞悬浮液，接种于 24 孔板上，每孔 1 mL，24 h 贴壁培养，换入含药培养液。第 6 天收集细胞上清液，按照病毒 DNA 制备试剂盒的操作步骤获得高纯度的 HBV DNA，运用乙型肝炎核酸定量检测试剂盒检测细胞上清液 HBV DNA 水平。

2 结果与分析

2.1 木榄生境中可培养细菌的多样性分布

2.1.1 木榄可培养细菌的多样性分析

本研究利用 10 种分离培养基，通过菌株形态学和 16S rRNA 基因测序技术进行排重，共获得可培养细菌 59 种，物种多样性分布如表 1 所示。59 种细菌归属于 4 门 5 纲 14 目 23 科 36 属，分别为 Actinobacteria（放线菌纲）10 属 15 种、Flavobacteria（黄杆菌纲）3 属 3 种、Bacillia（芽孢杆菌纲）6 属 17 种、Alphaproteobacteria（α-变形杆菌纲）10 属 13 种、Gammaproteobacteria（γ-变形菌纲）7 属 11 种。其中，*Bacillus*（芽孢杆菌属）为本次研究的优势菌属，分离得到菌株 9 株，占总菌株数的 15.3%；*Staphylococcus*（球菌属）为次优势菌属，共分离得到菌株 4 株，占比为 6.8%。

通过 EzBioCloud 服务器进行 16S rRNA 基因序列比对分析，有 3 株菌株与有效描述的物种表现出低序列相似性（<98.65%）（Kim et al., 2014），对潜在的新菌株进行了 16S rRNA 基因的完整测序后（>1 330bp）发现 GXIMD07402（GenBank 登录号 MT613339）与 *Pseudooceanicola aestuarii* E2-1^{T} 的最高相似度 96.33%，GXIMD07665（GenBank 登录号 MW709434）与 *Thioclava pacifica* DSM 10166^{T} 和 *Thioclava marina* MPZS01000005^{T} 的最高相似度均为 96.24%，GXIMD07384 与 *Aestuariibaculum suncheonense* SC17^{T} 的最高相似度为 98.52%，可能为新的物种。

表 1 木榄生境中可培养细菌的物种组成

Table 1 Distribution of culturable bacteria in the habitat of *Bruguiera gymnorrhiza*

属类群 Genera group	菌株编号 Strain number	最相近菌株 (BLAST) The most related species (BLAST)	相似度 Similarity (%)	来源 Source
Dietzia sp.	GXIMD07588	*D. aurantiaca*（FR821260）	99.12	1-1、1-3
Brevibacterium sp.	GXIMD08275	*B. casei*（X76564）	99.60	1-4

Demequina sp.	GXIMD07727	*D. maris*（BBLX01000020）	98.95	1-1
	GXIMD07550	*D. salsinemoris*（BBQZ01000002）	99.21	1-1、1-2
Janibacter sp.	GXIMD07490	*J. melonis*（AY522568)	99.51	1-1
Kytococcus sp.	GXIMD07662	*K. schroeteri*（AJ297722）	99.49	1-1
Microbacterium sp.	GXIMD07699	*M. oxydans* （Y17227）	100	1-1
	GXIMD07387	*M. thalassium*（AB004713）	99.20	1-1
Kocuria sp.	GXIMD07701	*K. arsenatis*（KM874399）	99.87	1-1
Micrococcus sp.	GXIMD08246	M. *luteus*（CP001628）	99.74	1-1、1-4
	GXIMD08005	*M. endophyticus*（EU005372）	99.09	1-1
	GXIMD08061	*M. Aloeverae （CP001628*）	100.00	1-1、1-4
Kitasatospora sp.	GXIMD07391	*K. albolonga*（AB184425）	99.62	1-1
Streptomyces sp.	GXIMD07709	*S. spiralis*（AB184575）	99.36	1-1
Myroides sp.	GXIMD07367	*M. odoratimimus* subsp. *Xuanwuensis*（jgi.1107767）	98.76	1-1、1-2
Sinomicrobium sp.	GXIMD07572	*S. oceani*（JQ352762）	100	1-2
Aestuariibaculum sp.	GXIMD07384	*A. suncheonense*（JF751043）	98.52	1-1
Bacillus sp.	GXIMD07385	*B. altitudinis*（ASJC01000029）	99.49	1-1、1-2、1-3、1-4
	GXIMD07622	*B. aryabhattai*（EF114313）	99.62	1-1
	GXIMD07385	*B. filamentosus*（KF265351）	99.74	1-1
	GXIMD07390	*B. siamensis*（AJVF01000043）	99.50	1-1、1-2、1-4
	GXIMD07462	*B. wiedmannii*（LOBC01000053）	99.1	1-1
	GXIMD07450	*B. funiculus*（AB049195）	99.87	1-4
	GXIMD08241	*B. pseudomycoides*	99.62	1-2
	GXIMD07715	（ACMX01000133）	99.57	1-3
	GXIMD07471	*B. vietnamensis*（AB099708）	99.33	1-1、1-2
		B. subtilis subsp. *Stercoris*（D7XPN1）		
Fictibacillus sp.	GXIMD07712	*F. enclensis*（JF893461）	98.69	1-1
Halobacillus sp.	GXIMD07459	*H. salinus*（AF500003）	98.85	1-1
Alkalihalobacillus sp.	GXIMD07696	*A. hwajinpoensis*（AF541966）	99.23	1-2
Cytobacillus sp.	GXIMD07748	*C. kochii*（FN995265）	99.87	1-1
Staphylococcus sp.	GXIMD07629	*S. arlettae*（AB009933）	100	1-1、1-4、1-2
	GXIMD08278	*S. aureus* subsp. *aureu*（AMYL01000007）	99.87	1-1、1-4
	GXIMD08273	S. warneri（L37603）	100	1-4、1-2
	GXIMD07366	*S. saprophyticus* subsp. *Saprophyticus*（AP008934）	99.36	1-3
Brevundimonas sp.	GXIMD08242	*B. vesicularis*（BCWM01000033）	99.62	1-4
Rhizobium sp.	GXIMD07370	*R. halophytocola*（GU322905）	98.97	1-2
Paracoccus sp.	GXIMD07420	*P. marcusii*（Y12703）	99.21	1-3、1-4
	GXIMD08265	*P. halotolerans*（KY039331）	98.67	1-4
Pararhodobacter sp.	GXIMD07616	*P. aggregans*（AM403160)	98.72	1-3
Pseudooceanicola sp.	GXIMD07402	*P. aestuarii*（MN929131）	96.33	1-1
	GXIMD07813	*P. nanhaiensis*（JHZF01000008）	98.69	1-2
Ruegeria sp.	GXIMD07799	*R. profundi*（LQBP01000024）	99.00	1-1
Thioclava sp.	GXIMD07665	*T. pacifica*（AUND01000024）	96.24	1-2
Salipiger sp.	GXIMD07369	*S. pacificus*（jgi.1055276）	99.45	1-1
Erythrobacte sp.	GXIMD07443	*E. flavus*（AF500004）	98.65	1-2
Qipengyuania sp.	GXIMD07468	*Q. aquimaris*（AY461441）	98.96	1-1
	GXIMD07576	*Q. vulgaris*（AY706935）	99.35	1-1、1-3
	GXIMD07445	*Q. pelagi*（HQ203045）	98.80	1-3
Shewanella sp.	GXIMD08125	*S. algae*（BALO01000089）	99.61	1-2
Microbulbifer sp.	GXIMD07512	*M. hydrolyticus*（AJ608704）	98.81	1-1
	GXIMD07784	*M. pacificus*（DQ993341）	99.87	1-1
	GXIMD07514	*M. salipaludis*（AF479688）	99.36	1-1、1-3
Pantoea sp.	GXIMD07363	*P. dispersa*（DQ504305）	100.00	1-1、1-4

Klebsiella sp.	GXIMD07545	*K. grimontii*（FZTC01000044）	99.87	1-1
Serratia sp.	GXIMD07526	*S. rubidaea*（AB004751）	98.85	1-1
Pseudomonas sp.	GXIMD07478	*P. kunmingensis*（JQ246444）	99.23	1-1
	GXIMD07516	*P. stutzeri*（CP002881）	99.75	1-3
Vibrio sp.	GXIMD07790	*V. azureus*（BATL01000140）	99.74	1-1
	GXIMD07687	*V. plantisponsor*（GQ352641）	99.72	1-1、1-2

注: **1-1**. 沉积物；**1-2**. 根；**1-3**. 叶；**1-4**. 胚轴。

Note: **1-1**. Sediment; **1-2**. Root; **1-3**. Leave; **1-4**. Hypocotyls.

2.1.2 木榄生境中可培养细菌在样品中的分布

木榄生境中可培养细菌在样品中的分布如图 1 和图 2 所示。木榄沉积物分离得到的菌株种类最为丰富，共获得菌株 27 属 40 种。木榄不同组织部位中，根分离得到的菌种数目最多共获得 12 属 17 种。木榄沉积物是放线菌纲的重要来源，其中 10 属 14 种细菌均从木榄沉积物获得，仅 *Brevibacterium casei* 分离自木榄胚轴。黄杆菌纲细菌均分离自沉积物和根，γ-变形菌纲细菌除 *Pseudomonas stutzeri* 外，其余 10 种均来源于木榄沉积物和根部。木榄胚轴和叶分离得到细菌丰富度较低，木榄胚轴分离得到菌株 7 属 13 种，叶分离得到种类最少为 7 属 9 种。

在属级水平上对木榄生境来源的细菌进行 Venny 分析，木榄沉积物和木榄各组织中仅存在一个共有菌属 *Bacillus*。沉积物和木榄根含有 *Demequina*、*Myroides*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Pseudooceanicola*、*Myroides*、*Vibrio* 7 个相同菌属，共有菌属丰富度明显优于沉积物和木榄其他组织部位。

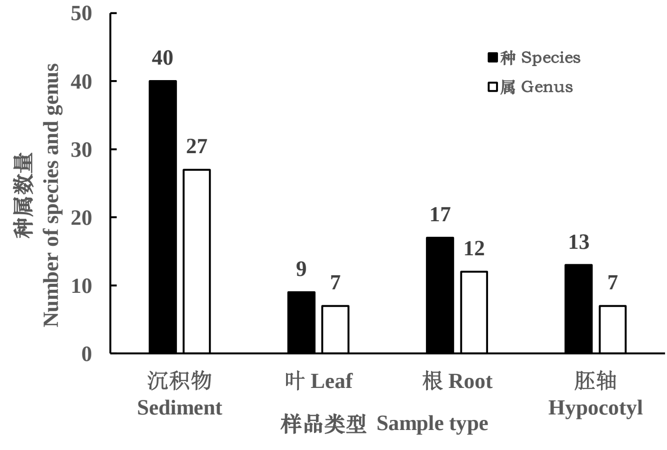


图 1 不同样品分离得到的细菌种属

Fig.1 Bacterial species and genera isolated from different samples

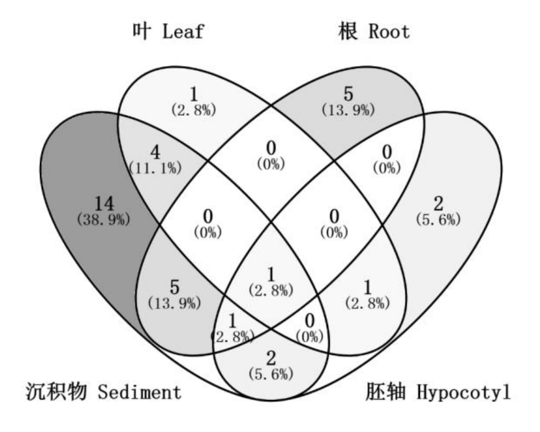


图 2 不同样品可培养细菌属级群类分布韦恩图

Fig.2 Venn diagram of the distribution of bacterial genera in different samples

2.1.3 不同培养基对木榄生境中可培养细菌的分离效果

10 种不同分离培养基分离效果如图 3 所示。2216E 培养基分离得到菌种数目最多，为 24 株，菌属分布最为广泛，包括 *Aestuariibaculum*、*Bacillus*、*Demequina* 等 11 属，两株新菌 GXIMD07402 和 GXIMD07384 均分离自该培养基。其次是 M7（20 种）、R2A（16 种）和 AGG（15 种）培养基，菌属丰富度较高，均分离得到 *Bacillus*、*Microbulbifer*、*Pantoea*、*Staphylococcus*、*Vibrio* 属菌株。P3 和 P7 得到菌株 9 属 14 种和 7 属 10 种，另一株新菌 GXIMD B331 分离自 P7 培养基。其余 4 种培养基 M5（5 种）、M9（8 种）、M10（6 种）和 M11（6 种）均分离得到 *Bacillus* 和 *Pantoea* 属菌株。从菌种数量、菌属丰富度和物种新颖性而言，2216E 培养基均为此次分离的最优介质。

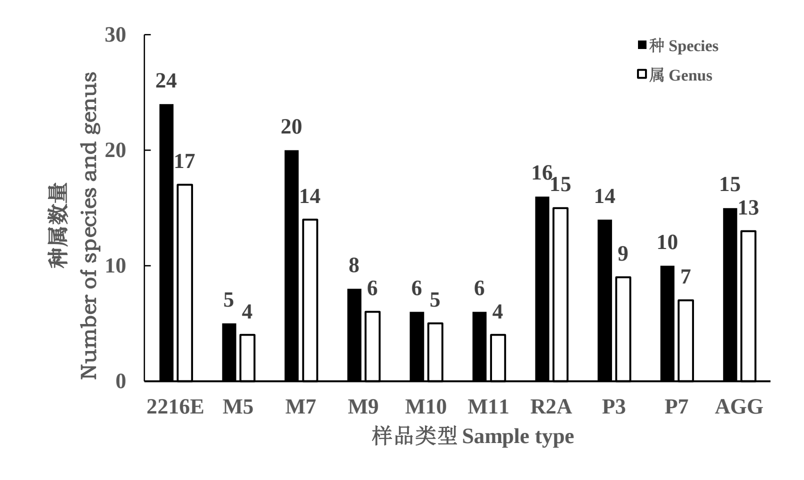


图 3 不同培养基的分离效果
Fig.3 Bacterial species and genus isolated from different media

2.2 木榄可培养细菌的抗乙肝病毒活性分析

2.2.1 木榄可培养细菌对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响

表 2 为利用 HPLC-DAD 技术筛选出菌株代谢产物较为丰富的 25 份样品和 2 份空白培养基对 HepG2.2.15 细胞增殖作用的影响。结果表明在 125 μg·mL^{-1} 浓度下，与空白组相比，2 份空白培养基作用下的细胞存活率无明显差异，即对细胞无毒副作用（$P>0.05$）。25 份菌株发酵产物中，14 份菌株代谢产物对 HepG2.2.15 细胞无明显的毒副作用，对细胞增殖无明显抑制作用，可以进一步测试 14 份样品对细胞分泌 HBV DNA 的抑制作用。

表 2 样品对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响（平均值±标准差, *n*=3）
Table 2 Proliferation effects of samples on HepG2.2.15 cells ($\bar{x}$±*s*, *n*=3）

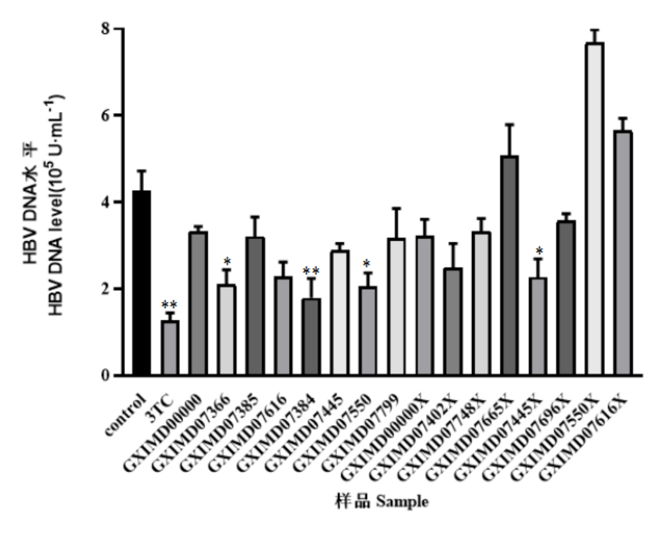
样品 Sample	细胞存活率 Cell viability（%）	细胞抑制率 Cell inhibition rate（%）
control	100.00±4.46	—
3TC	95.21±3.97	4.79
GXIMD00000	102.23±6.85Δ	—
GXIMD07445	100.41±3.51Δ	—
GXIMD07616	103.63±3.63Δ	—
GXIMD07550	120.26±4.62**Δ	—
GXIMD07696	83.99±15.28**	16.01
GXIMD07665	71.86±2.65**	28.14
GXIMD07748	89.10±4.70*	10.90
GXIMD07526	76.24±0.81**	23.76
GXIMD07363	60.69±3.98**	39.31
GXIMD07385	94.70±8.15Δ	5.3
GXIMD07387	78.74±1.24**	21.26
GXIMD08246	52.93±2.04**	47.07
GXIMD07402	85.12±2.51*	14.88
GXIMD07366	94.27±2.26Δ	5.73
GXIMD07384	109.48±2.04**Δ	—

GXIMD07490	69.60±1.54**	30.4
GXIMD07799	95.71±0.96Δ	4.29
GXIMD00000X	99.13±2.14Δ	0.70
GXIMD07445X	99.34±3.08Δ	0.66
GXIMD07616X	104.56±2.18Δ	—
GXIMD07550X	110.19±1.92**Δ	—
GXIMD07696X	97.04±11.67Δ	2.96
GXIMD07665X	104.89±3.46Δ	—
GXIMD07748X	91.31±4.54Δ	8.69
GXIMD07526X	84.84±2.44*	15.16
GXIMD07784X	87.17±2.71*	12.83
GXIMD07402X	107.80±6.72**Δ	—

注：与空白对照组比较，*表示差异显著（*P*<0.05），**表示差异极显著（*P*<0.01）；Δ表示对细胞无毒副作用组。—表示细胞抑制率为负值。
Note: * indicates significant differences (*P*<0.05) and ** indicates extremely significant differences (*P*<0.01), compared with blank control group; Δ indicates a group of non-toxic side effects. — indicates the cell inhibition rate is negative.

2.2.2 木榄可培养细菌对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBV DNA 的抑制作用实验

图 4 为无毒性发酵代谢产物样品对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBV DNA 的作用。由图 4 可知，与空白组相比，两份空白培养基对 HepG2.2.15 细胞上清水平无明显降低作用(*P*>0.05)。GXIMD07366(*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *Saprophyticus*)、GXIMD07616（*Pararhodobacter aggregans*）、GXIMD07384（*Aestuariibaculum suncheonense*）、GXIMD07550（*Demequina salsinemoris*）和 GXIMD07445X（*Erythrobacte citreus*）能显著降低 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 水平（*P*<0.05)，抑制率分别为 51%、47%、63%、52%、47%，GXIMD07384 的抗乙肝病毒效果最为显著，同 100 μg·mL^{-1} 阳性药物 3TC 作用相比，细胞上清中 HBV DNA 水平均有极显著降低（*P*<0.01)。



与空白对照组比较，*表示差异显著（*P*<0.05），**表示差异极显著（*P*<0.01）。
* indicates significant differences (*P*<0.05) and ** indicates extremely significant differences (*P*<0.01), compared with blank control group.

图 4 细菌代谢产物对 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 的影响
Fig.4 Effects of bacterial metabolites on HBV DNA in supernatant of HepG2.2.15 cell

2.3 GXIMD07384 代谢产物的分析

GXIMD07384（*Aestuariibaculum* sp.）为潜在新物种，其代谢产物能显著抑制 HepG2.2.15 中 HBV DNA 复制。利用 LC-HRMS 分析其主要代谢产物，初步鉴定了 4 个化合物，保留时间分别为 3.8、11.7、14.5、26.1 min，分子离子峰依次为$[M+H]^+$ 268.104 7、245.095 7、395.181 9 和 243.089 6，结合各色谱峰的二级质谱图碎片信息，初步推断化合物为 Adenosine（Kuchkarova et al., 2020）、Cyclo(*L*-Pro-*L*-OMet)（Yang et al., 2013）、

Acremine G（Arnone et al., 2008）和 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione（杨建香，2015）。

Adenosine　　Cyclo(L-Pro-L-OMet)

Acremine G　　7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione

图 5 活性菌株 GXIMD07384 中 4 个次级代谢产物结构

Fig.5 Structures of four secondary metabolites in active strain GXIMD07384

3 讨论与结论

红树林蕴藏着丰富而独特的微生物资源，微生物物种多样性的研究，是红树及微生物资源利用的重要内容。然而海洋中绝大多数微生物尚不能被现有的培养方法和技术进行分离培养，出现这种现象的一个重要原因是天然环境中很多微生物处于休眠状态，该状态是微生物在长期的进化过程中逐渐形成的可逆的低代谢活力的生存模式（Mu et al., 2018）。芽孢杆菌属菌株产淀粉酶、蛋白酶、葡聚糖、纤维素酶和几丁质酶等多种生物活性酶，与红树生态系统中高有机质环境相适应，因此其生长状态较为活跃，是红树可培养细菌中研究中的优势菌属（孙倩，2015；赵雅慧等，2018）。本研究对木榄生物样品中可培养细菌进行分离鉴定，共获得细菌 59 株，隶属于 36 属，其中芽孢杆菌属为优势菌属。尽管实验室培养条件与自然生境的巨大差异，利用传统培养技术发掘更多微生物物种受到极大制约。此次实验仍得到物种多样性较为丰富的红树细菌，包括 3 株潜在新物种，隶属于 *Pseudooceanicola*、*Thioclava* 和 *Aestuariibaculum* 属，目前报道 *Aestuariibaculum* 属细菌仅有 3 种（Jeong et al., 2013; Lee et al., 2013; Jiwon et al., 2018），均分离自海洋生境，扩充了红树微生物资源。随着科技的进步，自然环境营养成分的检测以及宏基因组测序技术的发展和富苏机制的探讨，可为培养技术提供借鉴，从而发掘更为丰富的微生物。

红树微生物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性，是活性天然产物的重要来源（洪葵，2013）。不同红树的微生物类群存在差异，微生物在与宿主植物长期的互作过程中，二者交换信息和遗传物质，从而有着类似或相同的代谢途径，生成相同或相似的活性代谢产物（王景仪等，2020）。前期研究从木榄植物中分离得到抗乙肝病毒活性化合物，本研究以转染 HBV 的 HepG2.2.15 细胞株为模型，发现 5 株细菌在药物浓度为 125 μg mL^{-1} 时，能显著降低细胞上清中 HBV DNA 水平，5 株活性菌株分别隶属于 *Staphylococcus*、*Pararhodobacter*、*Aestuariibaculum*、*Demequina.* 和 *Erythrobacter*，*Aestuariibaculum* 属菌株抗乙肝病毒活性效果极为显著，木榄植物和微生物均能产生抗乙肝病毒活性物质。其中 *Staphylococcus* 属菌株被指出其基因簇 ISK-1 编码产生的一种免疫蛋白 NukH，在宿主免疫中具有协同作用（Sashihara et al., 2013）。*Aestuariibaculum* 属菌株作为稀有菌属的潜在新菌株，同时抗乙肝病毒活性效果显著，说明在发酵过程中产生了抑制乙肝病毒的强活性代谢产物，因此得到了更多的关注。通过高分辨质谱数据初

步鉴定了 4 个主要代谢产物为 Adenosine、Cyclo (L-Pro-L-OMet)、Acremine G 和 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione。其中 Adenosine 作为核苷类化合物，已被证实在体外细胞实验中具有抗乙肝病毒活性，EC_{50} 值为 1.5 μmol·L^{-1}（董春红和常俊标，2005）。活性菌株浓度为 125 μg·mL^{-1}，其抑制率达到 63%，抗病毒效果强于 Adenosine，可能因为该菌株代谢产物中含有其他活性成分，二者协同发挥抗病毒作用。其活性菌株的代谢产物和作用机制仍有待进一步研究，植物和微生物的生态学关系也有待进一步探索。

木榄生境可培养细菌及抗乙肝病毒活性研究内容的开展，为抗乙肝病毒活性药物的发掘提供了新的药用来源，进一步完善了药用红树木榄的微生物物种及其药用价值。

参考文献:

ARNONE A, NASINI G, PANZERI W, et al., 2008. Acremine G, dimeric metabolite from cultures of *Acremonium byssoides* A20 [J]. J Nat Prod, 71(1): 146-149.

DING L, MAIER A, FIEBIG HH, et al., 2011. Divergolides A-D from a mangrove endophyte reveal an unparalleled plasticity in ansa-macrolide biosynthesis[J]. Angew Chem Int Ed, 50(7): 1630-1634.

DONG CH, CHANG JB, 2005. Advances of *L*-nucleoside anti-HIV and anti-HBV agents[J]. Prog Chem, 17(5): 916-923. [董春红，常俊标，2005. *L*-核苷类抗 HIV、HBV 活性化合物研究进展[J]. 化学进展， 17(5): 916-923.]

HONG K, 2013. Research progress of mangrove actinomycetes and their natural products[J]. Acta Microbiol Sin, 53: 1131-1141. [洪葵，2013. 红树林放线菌及其天然产物研究进展[J]. 微生物学报，53：1131-1141.]

JEONG SH, PARK MS, JIN HM, et al., 2013. *Aestuariibaculum suncheonense* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from a tidal flat and emended descriptions of the genera *Gaetbulibacter* and *Tamlana*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 63(1): 332-338.

JIANG ZK, TUO L, HUANG DL, et al., 2018. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun bstuary national nature reserve of Guangxi, China[J]. Front Microbiol, 9(4): 868-879.

JIWON C, DONGWOOK L, HYEONG JJ, et al., 2018. *Aestuariibaculum marinum* sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater in South Korea[J]. J Microbiol, 56(9): 614-618.

KIM M, OH HS, PARK SC, et al., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 64(1): 346-351.

KIM OS, CHO YJ, LEE K, et al., 2012. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 62(1): 716-721.

KUCHKAROVA NN, TOSHMATOV ZO, ZHOU S, et al., 2020. Secondary metabolites with plant growth regulator activity produced by an endophytic fungus *Purpureocillium* sp. from *Solanum rostratum*[J]. Chem Nat Compd, 56(4): 775-776.

LEE JB, KIM BC, Kim H, 2013. *Aestuariibaculum scopimerae* sp. nov., isolated from the globular ghost crab, *Scopimera globosa*[J]. J Microbiol, 51(6): 736–740.

LI F, GAO CH, YU L, et al., 2018. Diversity and antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Ruppia maritima*[J]. Guihaia, 38(7): 922–933. [李菲，高程海，余炼，等，2018. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究[J]. 广西植物，38(7): 924-933.]

LI F, HUANG SS, HU WJ, et al., 2021. Studies on endophytic and rhizosphere bacterial diversity and antifungal activity of semi-mangrove mango [J]. Chin J Antibiot, 46 (5): 396-405. [李菲，黄庶识，胡文进，等，2021. 半红树植物海芒果内生与根际细菌多样性及抗农用真菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志，46(5): 396-405.]

LI M, GAO CH, JIANG S, et al., 2020. Diversity and anti-aging activity of endophytic bacteria from true mangrove plants collected from the west coast of Hainan[J]. Guihaia, 40(3): 311-319. [李蜜，高程海，姜舒，等，2020. 海南西海岸真红树内生细菌多样性及其延缓衰老活性研究[J]. 广西植物，40(3): 311-319.]

LIN X, HETHARUA B, LIN L, et al., 2019. Mangrove sediment microbiome: adaptive microbial assemblages and their routed biogeochemical processes in Yunxiao mangrove national nature reserve, China[J]. Microb Ecol, 78:57–69.
MU D S, LIANG QY, WANG XM, et al., 2018. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing[J]. Microbiome, 6(1): 230-244.
RAN XQ, ZHANG G, LI S, et al., 2017. Characterization and antitumor activity of camptothecin f rom endophytic fungus fusarium solaniisolated from *Camptotheca acuminate*[J]. Afr Health Sci, 17(2): 566-574.
RAZAVI-SHERAER D, GAMKRELIDZE I, NGUYEN M H, et al., 2018. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 3(6): 383–403.
SARIN SK, 2016. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update[J]. Hepatol Int, 10(1): 1–98.
SASHIHAR T, KIMURA H, HIGUCHI T, et al., 2000. A novel Lantibiotic, Nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and Identification of the structure[J]. J Agric Chem Soc Jpn, 64(11): 2420-2428.
SHI H, HAN Z, LIU J, et al., 2017. Comparing efficacy of lamivudine, adefovir dipivoxil, telbivudine, and entecavir in treating nucleoside analogues naive for HBeAg-negative hepatitis B with medium hepatitis B virus (HBV) DNA levels [J]. Med Sci Monitor, 23(1): 5230-5236.
SUN Q, LIN HP, 2015. Research status of strains producing cellulase in mangrove environment [J]. Guangdong Chem Indust, 42(18): 119+134. [孙倩，林海鹏，2015. 红树林环境产纤维素酶菌株的研究现状[J]. 广东化工，42(18)：119+134.]
WANG H, MEN P, XIAO Y, et al., 2019. Hepatitis B infection in the general population of China: A systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 19(1): 1–10.
WANG JY, LI MQ, LI YR, et al., 2014. Research progress on diversity and biological function of endophytic fungi inmedicinal plants[J]. Biotic Resour, 42 (2) : 164-172. [王景仪，李梦秋，李艳茹，等，2014. 药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展[J]. 生物资源，42 (2)：164-172.]
WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 10(4): 506-513.
YANG JX, 2015. Metabolites of mangrove endophytic fungus Sk-2 from the South China Sea[J]. J Guilin Normal Coll, 29(4): 170-172 . [杨建香，2015. 南海红树林内生真菌 Sk-2 代谢产物研究[J]. 桂林师范高等专科学校学报，29(4): 170-172.]
YANG XQ, YANG YB, ZHOU H, et al., 2013. New megastigmane glycoside and alkaloids from *Streptomyces* sp. YIM 63342[J]. Nat Prod Res, 27(13): 1191-1196.
YAN LL, HAN NN, ZHANG YQ, et al., 2010. Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant[J]. J Antibiot, 63(5): 259-261.
YI XX, DENG JG, GAO CH, et al., 2015. Four new cyclohexylideneacetonitrile derivatives from the hypocotyl of mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*)[J]. Molecules, 20(8): 14565-14575.
ZHANG E, KOSINSKA A, LU M, et al., 2015. Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B, fifty years after discovery of the virus: Search for the “magic bullet” to kill cccDNA[J]. Antivir Res, 123: 193-203.
ZHANG S, HUANG SS, YANG JF, et al., 2016. Preliminary study on the medicine of the Jing nationality [J]. Chin Nat Folk Med, 25 (2) : 1-2. [张帅，黄思诗，杨家福，等，2016. 京族医药初探[J]. 中国民族民间医药，25(2)：1-2.]
ZHAO YH, ZHANG SL, WU JF, et al., 2018. Screening the diversity and activity of culturable bacteria isolated from mangrove rhizosphere soil at Shankou[J]. J Mar, 40(8): 138-151. [赵雅慧，张舒琳，吴家法，等，2018. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. 海洋学报，40(8)：138-151.]
ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by chelex-100[J]. Biotechnol Bull, 22(2): 123–125. [周双清，黄小龙，黄东益，等，2010. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报，22(2)：123-125.]